

(19)日本国特許庁 (J P)

(12)公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-192073

(43)公開日 平成6年 (1994) 7月12日

(51)Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/12	A D U	9283-4C		
	A D S	9283-4C		
	A G A	9283-4C		
31/045	A D V	9283-4C		

審査請求 未請求 請求項の数9 (全 13 頁)

(21)出願番号 特願平4-357256

(22)出願日 平成4年 (1992) 12月24日

(71)出願人 000000217

エーザイ株式会社

東京都文京区小石川4丁目6番10号

(72)発明者 酒井 達

埼玉県本庄市北堀 450-247

(72)発明者 田中 智英

埼玉県本庄市駅南2-8 エトワール本庄704

(72)発明者 佐藤 加名

埼玉県児玉町八幡山 392-6

(72)発明者 日比 孝

埼玉県本庄市南 2-6-5 エーザイ青雲寮

最終頁に続く

(54)【発明の名称】細胞分化誘導剤

(57)【要約】

【目的】 従来、臨床的有用性の高い医薬品のなかった、細胞分化誘導作用に基づく造血器腫瘍・固形腫瘍などの疾患の治療・改善剤を提供する。

【構成】 従来の癌薬物治療法の基礎となる考え方は、増殖能が異常に高い腫瘍細胞をすべて死滅させるというものであるが、正常細胞に対しても毒性を示すため重篤な副作用が避けられず治療効果にも限界があった。しかし安全性が極めて高い潰瘍・胃炎治療剤であるゲラニルゲラニルアセトン等の化合物は、意外にも細胞分化誘導作用も有しており、造血器腫瘍・固形腫瘍等の各種癌・悪性腫瘍の治療・改善剤となり得る。さらにレチノイン酸等の制ガン剤と併用すると制癌剤の効果を増強する作用もあり、併用療法を行えば制ガン剤の使用量を削減し副作用を軽減することが可能となり、癌患者のクオリティー・オブ・ライフの改善に大きく貢献する臨床上有用性の高い癌・悪性腫瘍の治療・改善剤となり得る。

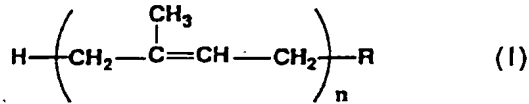
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記一般式で表される化合物(I)を有効成分とする細胞分化誘導剤。

【化1】



〔式中Rは低級アシルアルキル基または低級ヒドロキシアルキル基を、nは2～6の整数を意味する。〕

【請求項2】 造血器腫瘍治療剤である請求項1記載の細胞分化誘導剤。

【請求項3】 急性白血病、慢性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症からなる群より選ばれた疾患の治療・改善剤である請求項2記載の細胞分化誘導剤。

【請求項4】 固形腫瘍治療剤である請求項1記載の細胞分化誘導剤。

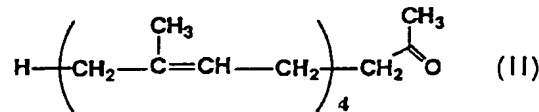
【請求項5】 脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、胆嚢・胆管癌、脾癌、脾島細胞癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、胎児性横紋筋肉腫、網膜芽細胞腫からなる群より選ばれた疾患の治療・改善剤である請求項4記載の細胞分化誘導剤。

10 【請求項6】 化合物(I)を有効成分とする制癌剤の効果を増強する細胞分化誘導剤。

【請求項7】 化合物(I)を有効成分とする細胞分化誘導作用が有効な疾患の治療・改善剤。

【請求項8】 化合物(I)が6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(II)である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の細胞分化誘導剤。

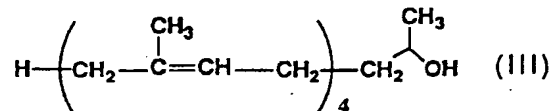
【化2】



【請求項9】 化合物(I)が6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オール(III)である請求項1ないし7のいずれか1項に記載の細胞分化誘

導剤。

【化3】



【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞分化誘導(以下、分化誘導)作用に基づく造血器腫瘍・固形腫瘍などの疾患の治療・改善剤に関する。

【0002】

【発明の背景】わが国における死亡原因の第一位を癌が占めるようになって久しく、しかも患者数は年々増加してきており、有効性および安全性の高い薬剤や治療法の開発が、今や国民・研究者・行政の最大関心事となっている。

【0003】癌(腫瘍)は発現部位・病理像・症状等により多岐に分類されるが、造血器腫瘍の代表的疾患である白血病は血液細胞(白血球)の腫瘍であり、未分化の各種幼若型白血球細胞の増殖が特徴である。またそれらの中でも、増加している腫瘍細胞が未成熟な芽球であるものを急性白血病、成熟細胞であるものを慢性白血病と分類しており、多岐にわたる臨床症状を呈するが、その多くは、正常造血の抑制に基づく症状と、他臓器への浸

潤・圧迫に基づく症状に大別することができる。具体的には、正常血球細胞の現象は赤血球減少による貧血・顆粒球減少による感染症や発熱・血小板の減少による出血傾向として現れ、正常造血の抑制は骨髓不全を招く。癌が予後不良な疾患であることは一般よく知られるところであり、これまでも種々の薬剤や治療方法が検討されてきた。

【0004】それらの中でも薬物治療法の基礎となる考え方は、腫瘍細胞である白血病細胞をすべて死滅させることにより治療効果を得るというものであり、したがってよりよい治療成績を上げるために、増殖能が異常に高い腫瘍に対し、細胞毒性による殺細胞作用をより強力に有する薬剤の開発や、併用療法、高濃度・多量投与療法などが試みられてきた。しかしこれらの薬剤や治療法は、腫瘍細胞だけに特異的に作用するのではなく、正常細胞に対しても毒性を示すため、心臓・心筋障害、骨髓機能抑制、悪心・嘔吐、神経障害、脱毛等の重篤な副作用が発現し、治療効果にも限界があった。

【0005】一方、従来の制癌剤と比較して安全性のよ

り高い各種分化誘導剤が、*in vitro*において腫瘍細胞を成熟細胞へ分化誘導する事実は知られており、分化誘導療法への期待が集まっていたが、残念ながら従来の分化誘導剤では臨床での有用性が認められなかった。しかし1988年にヒュン(Huang)らが、オールトランス-レチノイン酸(以下、RA)が急性前骨髄性白血病(以下、APL)患者に対し100%に近い完全寛解をもたらした臨床成績を報告して以来[ブラッド(Blood), 72,567-572,1988.]、世界各国においてその効果が再確認され、造血器腫瘍のみならず固形腫瘍を含めた広い範囲の癌に対する分化誘導療法に期待が高まりつつある。

【0006】

【従来技術】前述のように、RAが臨床において APLに有効であることは、ヒュン(Huang)ら[ブラッド(Blood), 72,567-572,1988.]を始め、キャストン(Castaigne)ら[ブラッド(Blood), 76,1704-1709,1990.]、ワーレル(Warrell)ら[ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディスン(New Engl.J.Med.), 324,1385-1393,1991.]など、多く研究者が報告している。

【0007】またオルソン(Olsson)らは、ビタミンD₃の生理活性型代謝物である 1 α ,25-ジヒドロキシコレカルシフェロール(以下、活性V.D₃)が、ヒト・リンパ腫培養細胞系(U937)において分化誘導作用を有することを報告している[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 43(12Pt1),5862-5867,1983.]。これより分化誘導作用を有する活性V.D₃誘導体の開発も盛んに行われるようになり、例えば特開昭61-33165号公報には24-アルキルデヒドロビタミンD₃誘導体が抗腫瘍作用を有することが、また特開昭 61-140560号公報には20-オキサ-21-ノル-ビタミンD₃誘導体が分化誘導作用を有することが、それぞれ開示されている。

【0008】ツェン(Zhang)らは、ブファリン(Bufalin)がヒト白血病細胞の培養細胞系であるHL60、U937および ML1において分化誘導作用を示したことを報告している[バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ(Biochem.Biophys.Res.Comm.), 178(2),686-693,1991.およびキャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 52(17),4634-4641,1992.]。

【0009】また上記以外にも分化誘導作用を有する化合物として、バッカーニ(Baccarani)らはントシン・アラビノシド(Ara-C)を[ブリティッシュ・ジャーナル・オブ・ヘマトロジー(Br.J.Haematol.), 42,485-487,1979.]、モーリン(Morin)らはアクラシノマイシンAを[キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 44,2807-2812,1984.]、森屋らはインターフェロン- α を[臨床血液, 32,170-172,1991.]に報告している。

【0010】石倉らは、マウス骨髄球性白血病の培養細胞系を用いて、ゲラニル・ファルネソール(3,7,11,15,19-ペンタメチル-2,6,10,14,18-エイコサペンタエン-1-オール)が分化誘導作用を有することを報告している

[ロイケミア・リサーチ(Leukemia Res.), 8(5),843-852,1984.]。

【0011】

【本発明が解決しようとする問題点】RAおよびその誘導体は、皮膚癌や難治性皮膚角化疾患である乾癬の治療に利用されているが、脂溶性が極めて高いため、長期間投与すると肝臓の肥大・神経異常・食欲不振・嘔吐・脱毛・そう痒感等のビタミンA過剰症状を発現しやすいことが広く知られており、かつ投与を中止しても肝臓や組織に長期間残留するため、副作用が一度発現すると長期間消失しない重大な欠点がある。またRAが APLに有効であることは前述の通りであるが、APLが全白血病患者中に占める割合は約5%と非常に少なく、他の多くのタイプの急性白血病患者にはほとんど無効であった。さらに寛解後も投与を中止すると再発しやすい問題もある。

【0012】ビタミンD₃誘導体は骨粗鬆症などの治療に利用されているが、腸管でのカルシウム吸収および腎臓におけるカルシウム再吸収を促進するので、投与量が過剰になると高カルシウム血症を引き起こし、石灰沈着に起因する腎臓障害や消化器障害をもたらすことが知られている。このため投与期間中は定期的に血清カルシウム値を検査しなければならず、臨床では非常に使いにくい問題点がある。さらにビタミンD₃誘導体の分化誘導作用は、ヒト前骨髄球性白血病の培養細胞系であるHL60には有効であるが、他のタイプのモデルにおいては有効性が認められていない。

【0013】ブファリンは臨床には応用されていないため、その安全性に関して全く不明であり、ヒトでの有用性を予測することはできなかった。

【0014】さらにシトシン・アラビノシドやアクラシノマイシンAも安全性上の問題から国内では薬剤として許可されておらず、インターフェロン- α の抗腫瘍作用も期待されたほどではなかった。

【0015】ゲラニル・ファルネソールの分化誘導作用に関する評価結果はマウス白血病細胞培養細胞系におけるものである。その後ヒト白血病細胞培養細胞系での評価結果は全く報告されていないので、種の異なる細胞間での薬剤感受性の差を考慮すると、ヒトでの有効性は一切不明であった。

【0016】このように、各種癌に対して優れた有効性と安全性を兼ね備えた薬剤はないのが現状であり、臨床で広範囲の癌に対し有用性の高い医薬品の開発が強く望まれていた。

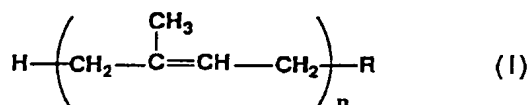
【0017】

【課題を解決するための手段】本発明にかかる、6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(一般名:ゲラニル・ゲラニル・アセトン、以下GGA)等の化合物は抗潰瘍作用および抗胃炎作用を有する化合物として特公昭63-44726号公報および特開昭62-10013号公報に開示されており、すでに臨床において胃炎

・胃潰瘍治療剤として広く用いられている。これらの化合物は粘膜保護修復作用・細胞増殖賦活作用・リン脂質合成促進作用など多彩な薬理作用を有することが知られており、かつ毒性が極めて低く、臨床においても特筆される副作用も認められず、優れた医薬品として利用されている。本発明者らは、これらの化合物群の多彩な生理活性と、臨床において長期間使用した際も安全性が高いという要件を備えていることに着目し、永年他の疾患への有効性も検討してきた。その結果、意外にも下記一般式(I)で表される化合物が分化誘導作用も有しており、造血器腫瘍・固形腫瘍などの各種癌に対する治療・改善剤として所期の目的を達成できること、さらに他の制癌剤との併用により制癌効果を一層増強することも見出し本発明を完成した。

【0018】

【化4】



【0019】 γ 〔式中Rは低級アシルアルキル基または低級ヒドロキシアルキル基を、 n は2～6の整数を意味する。〕

【0020】したがって本発明の目的は、分化誘導作用を有する臨床的有用性の高い、各種癌に対する治療・改善剤を提供することにある。具体的には一般式(I)で表される化合物を有効成分とする、造血器腫瘍・固形腫瘍等の各種癌・悪性腫瘍の治療・改善剤、制癌剤の効果を増強する分化誘導剤、および本化合物の分化誘導作用が有効な疾患の治療・改善剤に関する。ここで造血器腫瘍の具体的疾患名の一例としては、例えば急性白血病、慢性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症などを挙げることができ、また固形腫瘍としては、例えば脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、胆嚢・胆管癌、膵癌、膵島細胞癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、前立腺癌、睾丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、胎児性横紋筋肉腫、網膜芽細胞腫などを挙げることができるが、本発明の対象疾患がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0021】また本発明においては上記治療・改善剤としての有効性に加え、長期間投与しても極めて高い安全性が期待できる。さらに、RA、ビタミンD₃誘導体、ブファリン、エトボシド、腫瘍壊死因子(以下、TNF)- α 、インターフェロン等の他の制癌剤との併用により制癌効果を一層増強できることから、併用により、効果はシャープであるが副作用も非常に強い従来の制癌剤の使用量を削減することも可能となり、制癌効果は保ちつつ副作用は軽減して長期間治療を続けることができ、癌患

者のクオリティー・オブ・ライフの改善に大きく貢献する発明であると言える。

【0022】本発明にかかる化合物(I)の一般式において、Rは低級アシルアルキル基または低級ヒドロキシアルキル基を意味する。具体的には例えば低級アシルアルキル基としてアセトキシメチル基、プロピオニルメチル基、ブチリルメチル基、バレリルメチル基、アセトキシエチル基、プロピオニルエチル基、ブチリルエチル基、バレリルエチル基、ベンゾイルメチル基、トルオイルメチル基等の炭素数2～6の脂肪族アシル基または芳香族アシル基で置換された炭素数2～6の低級アルキル基を、低級ヒドロキシアルキル基として1-ヒドロキシエチル基、2-ヒドロキシエチル基、1-ヒドロキシ- n -プロピル基、2-ヒドロキシ- n -プロピル基、3-ヒドロキシ- n -プロピル基、1-ヒドロキシ- n -ブチル基、2-ヒドロキシ- n -ブチル基、3-ヒドロキシ- n -ブチル基、4-ヒドロキシ- n -ブチル基、ヒドロキシアミル基、ヒドロキシヘキシル基などの炭素数2～6の基を挙げることができる。さらにこれらの基の中でもアセトキシメチル基または2-ヒドロキシ- n -プロピル基を有する化合物が、薬理活性上の観点からはより好ましい。

【0023】また n は2～6の整数を意味するが、同様に薬理活性上の観点からは $n=4$ の化合物が最も好ましい。

【0024】さらに化合物(I)は分子内に二重結合を有し、各種の幾何異性体(cis,transまたはZ,Eで示される立体異性体)が存在するが、本発明にはそれらすべてが含まれることは言うまでもない。また本発明においては、これらの幾何異性体のうち1種類のみを用いてもよいし、2種類以上の幾何異性体の混合物を用いてもよく限定されない。また化合物(III)は分子内に不斉炭素原子を1個有し、2種類の光学異性体が存在するが、本発明においてはこれらの光学異性体のうち一方のみを用いてもよいし、2種類の光学異性体の混合物を用いてもよく限定されない。

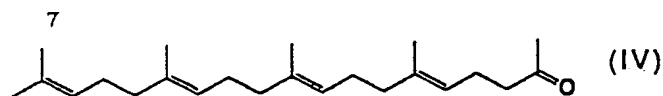
【0025】ここでこれらの化合物の中でも好ましい化合物の1例としては、化合物(II)の幾何異性体の1つである(5E,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(IV)および(5Z,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(V)を、また化合物(III)の幾何異性体の1つである(5E,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オール(VI)および(5Z,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オール(VII)等を挙げることができるが、本発明がこれらの化合物に限定されないことは言うまでもない。上記化合物の構造式を以下に示す。

【0026】

【化5】

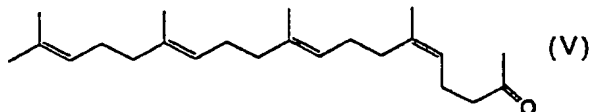
(5)

8



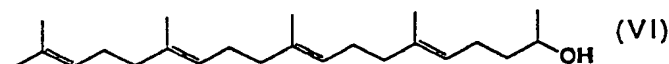
【0027】

【化6】



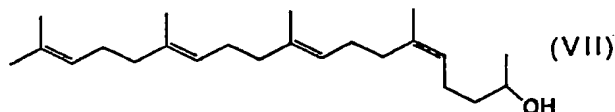
【0028】

【化7】



【0029】

【化8】



【0030】なお一般式(I)で表される化合物のうちRが低級アシルアルキル基であるものの製造法は、すでに特公昭63-44726号公報および特開昭62-10013号公報に開示されており、記載された製造例にしたがって合成することができるが、代表例を以下に製造例として示す。またRが低級ヒドロキシアルキル基であるものについては、以下の製造例にしたがい、Rが低級アシルアルキル基である化合物を水素化ホウ素ナトリウムで還元して得ることができる。さらに一部の化合物(I)については天然由来物あるいは合成物を、医薬・香料・化粧品・食品・化成品・化学工業用等の原料として入手可能であり、

20 これらを利用することもできる。

【0031】以下に本発明にかかる代表的な化合物の製造例を示すが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0032】

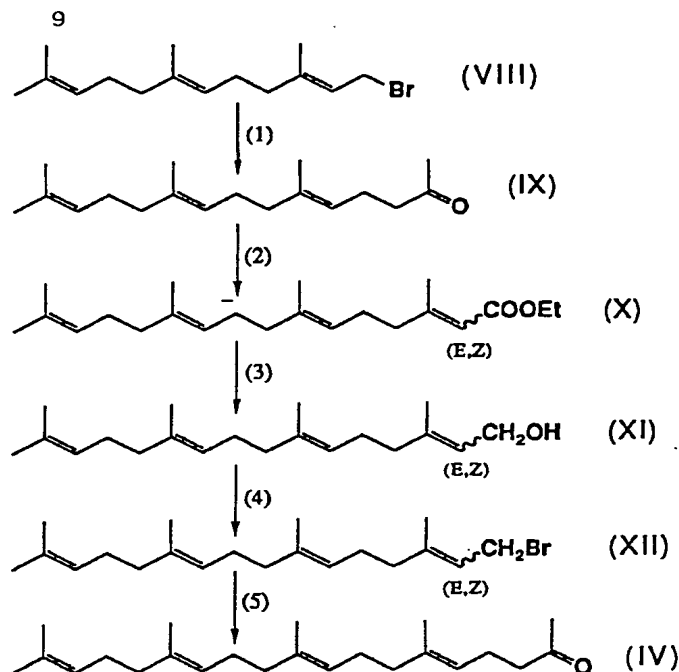
【製造例】

製造例1 (5E,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(IV)の合成

【0033】

【化9】

30



【0034】工程(1); 10%油性水素化ナトリウム 10.0g (41.7mmol)を無水テトラヒドロフラン(200ml)に懸濁し、氷冷・窒素気流下、アセト酢酸エチル 5.5g(42.3mmol)を滴下し30分間攪拌した。氷冷・窒素気流条件を保ち、ここに(2E,6E)-1-ブromo-3,7,11-トリメチル-2,6,10-ドデカトリエン(VIII)(アルドリッチ社製、フェルネシルブロミド) 10.0g (35.1mmol)を滴下しその後1時間攪拌を続け反応液を水中に加えた。n-ヘキサン(50ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をエタノール(50ml)に溶解し、水酸化カリウム6.0gを加えて2時間加熱還流した。反応液を冷却後水中に加え希塩酸で中和した後、n-ヘキサン(50ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:ベンゼン系)で精製して(5E,9E)-6,10,14-トリメチル-5,9,13-ペンタデカトリエン-2-オン(IX) 6.6gを得た。

【0035】工程(2); 10%油性水素化ナトリウム 5.2g (21.7mmol)を無水テトラヒドロフラン(50ml)に懸濁し、氷冷・窒素気流下、トリエチルホスホノアセテート 5.1g(22.8mmol)を滴下し30分間攪拌した。ここに化合物(IX) 5.0g(19.1mmol)を滴下しその後1時間攪拌を続け反応液を水中に加えた。n-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:ジエチルエーテル系)で精製して[(1E:Z),5E,9E,13E]-2,6,10,14-テトラメチル-1,5,9,13-ペンタデカテトラエンニル酢酸エチル(X) 5.6gを得た。

【0036】工程(3); 化合物(X) 5.0g(15.1mmol)を無水テトラヒドロフラン(50ml)に懸濁し、氷冷・窒素気流下、3.4M-水素化(2-ビスメトキシエトキシ)アルミニウムナトリウム・トルエン溶液(アルドリッチ社製、商品名: Red-Al) 7.0mlを滴下した。1時間攪拌を続けた後希塩酸(5ml)を滴下し、反応液を水中に加えた。n-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を希塩酸および水で洗った後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(n-ヘキサン:ジエチルエーテル系)で精製して[(2E:Z),6E,10E,14E]-3,7,11,15-テトラメチル-2,6,10,14-ヘキサデカテトラエン-1-オール(XI) 3.3gを得た。

【0037】工程(4); 室温にて化合物(XI) 3.0g(10.3mmol)を、47%-臭化水素酸(50ml)に懸濁し2時間攪拌した。反応液を水中に加え、n-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮して[(2E:Z),6E,10E,14E]-1-ブromo-3,7,11,15-テトラメチル-2,6,10,14-ヘキサデカトリエン(XII)を得た。

【0038】工程(5); 10%油性水素化ナトリウム 2.8g (11.7mmol)を無水テトラヒドロフラン(30ml)に懸濁し、氷冷・窒素気流下、アセト酢酸エチル 1.6g(12.3mmol)を滴下し30分間攪拌した。氷冷・窒素気流条件を保ち、ここに前記工程(4)で得られた化合物(XII)の全量を滴下し、その後1時間攪拌を続け反応液を水中に加えた。n-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をエタノール(30ml)に溶解し、水酸化ナトリウム 1.5gを加えて

2時間加熱還流した。反応液を冷却後水中に加え希塩酸で中和した後、*n*-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣を-40℃において*n*-ヘキサンから結晶化し、さらにシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン：ベンゼン系)で精製して標題化合物 1.1gを得た。

【0039】製造例2 (5Z,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン(V)の合成

前記、製造例1での化合物(IV)の結晶化母液をシリカゲル・カラムクロマトグラフィー(*n*-ヘキサン：ベンゼン系)で精製して標題化合物 0.5gを得た。

【0040】製造例3 (5E,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オール(VI)の合成

化合物(IV) 2.0g(6.1mmol)をメタノール(20ml)に溶解し、水素化ホウ素ナトリウム 0.4g(10.5mmol)を水(2ml)に溶解して滴下した。2時間攪拌した後アセトン(5ml)を滴下し、反応液を水中に加えて*n*-ヘキサン(30ml)で2回抽出し、有機層を水洗後無水硫酸ナトリウムで乾燥し減圧濃縮した。残渣をシリカゲル・カラムクロマト

6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オンの急性毒性
(LD₅₀: mg/Kg) [(5E,9E,13E)体 : (5Z,9E,13E) = 3 : 2の混合物]

動物種	性別	経口	筋肉内	皮下	腹腔内
マウス (ICR系)	♂	>15,000	>5,000	>10,000	3,750
	♀	>15,000	>5,000	>10,000	3,850
ラット (SD系)	♂	>15,000	>5,000	>10,000	>5,000
	♀	>15,000	>5,000	>10,000	3,500~5,000

【0046】表1から明らかなように、本発明化合物のLD₅₀値は経口投与での臨床用量の約1万倍以上であり、安全性が極めて高いことが明らかである。

【0047】投与剤型としては、例えば散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤などの経口製剤および注射製剤が挙げられる。製剤化の際には、通常の製剤担体を用いて常法により製造することができる。

【0048】すなわち経口製剤を製造するには、化合物(I)と賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。

【0049】賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスターチ、白糖、ブドウ糖、マンニトール、ソルビット、結晶セルロース、二酸化ケイ素などが、結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポ

グラフィー(*n*-ヘキサン：ジエチルエーテル系)で精製して標題化合物 1.7gを得た。

【0041】製造例4 (5Z,9E,13E)-6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オール(VII)の合成

製造例3と同様にして化合物(V)から、標題化合物を得た。

【0042】次に本発明化合物の代表例として、6,10,14,18-テトラメチル-5,9,13,17-ノナデカテトラエン-2-オン[(5E,9E,13E)異性体(IV)と(5Z,9E,13E)異性体(V)の3:2の混合物]の急性毒性試験結果を示す。

【0043】

【急性毒性試験】

(方法) 7~8週齢のSD系ラットおよびICR系マウスをそれぞれ雄雄各5匹用い、経口・筋肉内・皮下・腹腔内投与による単回投与毒性試験を実施した(媒体：5%アラビアゴム)。

【0044】(結果) LD₅₀値(mg/Kg)を下表にまとめる。

【0045】

【表1】

リビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシエチレン・ブロックポリマー、メグルミンなどが、崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が、滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が、着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脳、芳香散、ハッカ油、竜脳、桂皮末等が用いられる。これらの錠剤・顆粒剤には糖衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。

【0050】また注射用製剤を製造する際には、化合物(I)にpH調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤などを加えて、常法により製剤化する。

【0051】外用剤を製造する際の方法は限定されず、常法により製造することができる。すなわち製剤化にあ

たり使用する基剤原料としては、医薬品、医薬部外品、化粧品等に通常使用される各種原料を用いることが可能である。

【0052】使用する基剤原料として具体的には、例えば動植物油、鉱物油、エステル油、ワックス類、高級アルコール類、脂肪酸類、シリコン油、界面活性剤、リン脂質類、アルコール類、多価アルコール類、水溶性高分子類、粘土鉱物類、精製水などの原料が挙げられ、さらに必要に応じ、pH調整剤、抗酸化剤、キレート剤、防腐防微剤、着色料、香料などを添加することができるが、本発明にかかる外用剤の基剤原料はこれらに限定されない。また必要に応じて他の分化誘導作用を有する成分、血流促進剤、殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、アミノ酸、保湿剤、角質溶解剤等の成分を配合することもできる。なお上記基剤原料の添加量は、通常外用

<処方>

原料	配合量 (mg)
1) GGA	100.0
2) 無水ケイ酸	100.0
3) マンニット	450.0
4) ヒドロキシプロピルセルロース	40.0
5) d1- α -トコフェロール	0.2
6) タルク	10.0
7) 乳糖	約 300.0

【0057】実施例2 錠剤

【表3】

【0058】

<処方>

原料	配合量 (mg)
1) GGA	10.0
2) ヒドロキシプロピルセルロース	50.0
3) 乳糖	100.0
4) トウモロコシデンプン	20.0
5) 無水ケイ酸	3.0
6) ステアリン酸マグネシウム	0.2
7) マクロゴール8000	3.0
8) ポリビニルピロリドン	0.8
9) アラビアゴム末	3.0
10) 沈降炭酸カルシウム	4.0
11) 酸化チタン	10.0
12) タルク	15.0
13) 白糖	約 60.0

【0059】実施例3 注射剤

【表4】

【0060】

<処方>

原料	配合量 (重量%)
1) GGA	1.0
2) ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート	3.5
3) D-ソルビトール	5.0
4) リン酸水素1Na	0.08
5) リン酸水素2Na	0.07
6) 精製水	加えて100.0

【0061】実施例4 外用剤

【表5】

【0062】

剤の製造にあたり設定される濃度になる量である。

【0053】本発明における化合物(I)の臨床投与量は、症状、重症度、年齢、合併症などによって異なり限定されず、また化合物の種類・投与経路などによっても異なるが、通常成人1日あたり0.1mg~10gであり、好ましくは1mg~5gであり、さらに好ましくは10mg~1gであり、これを経口、静脈内または経皮投与する。

【0054】次に本発明を具体的に説明するため以下に実施例を掲げるが、本発明がこれらだけに限定されないことは言うまでもない。

【0055】

【実施例】

実施例1 顆粒剤

【0056】

【表2】

<処方>

原料	配合量(重量%)
1) GGA	1.0
2) スクワラン	10.0
3) ミリスチン酸イソプロピル	7.0
4) ベヘニルアルコール	1.0
5) セトステアリアルアルコール	5.6
6) ステアリン酸モノグリセリン	2.0
7) d- α -トコフェロール	0.05
8) POE(20)モノステアリン酸ソルビタン	2.0
9) キサンタンガム	0.1
10) 1,3-ブチレングリコール	2.0
11) グリセリン	3.0
12) ソルビトール	5.0
13) パラベン	0.2
14) 精製水	加えて100.0

【0063】

【発明の効果】次に本発明化合物の分化誘導剤としての有用性を示すため、各種ヒト白血病細胞培養系に対する効果実験例を挙げる。なお実験に用いた細胞系は以下の通りである。

- (1) ML1 ; ヒト骨髓芽球様白血病細胞
- (2) U937 ; ヒト単芽球様白血病細胞
- (3) HL60 ; ヒト前骨髓性白血病細胞

【0064】(方法)本発明にかかる分化誘導作用の評価は、文献に記載されている方法〔中谷ら、キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 48, 4201-4205, 1988.〕にしたがって行い、下記分化誘導マーカーについて測定・評価した。

- (1) 正常細胞への分化誘導マーカーであるニトロブルーテトラゾリウム(以下、NBT)還元能は、細胞をNBT試薬と37℃で40分間インキュベートし、還元されて生じたフォルマザンを顕微鏡で観察して評価した。
- (2) 顆粒球への分化誘導マーカーであるAS-D-クロロアセテートエステラーゼ活性と、単球への分化誘導マーカーである α -ナフチルアセテートエステラーゼ活性を、シグマ社製のエステラーゼ活性測定キットを用いて評価した。
- (3) 正常細胞への分化を示すマーカーである食食能は、細胞とポリスチレンラテックスビーズを37℃で4時間インキュベートし、10個以上のビーズを取り込んだ細胞数をカウントした。細胞のviability(生細胞の割合)は

トリバンプルー試薬で染色されない細胞を生細胞とし、全体の細胞数に対する百分率を算出した。

【0065】(結果)

実験1 ヒト骨髓芽球様白血病細胞 ML1に対する分化誘導作用

ヒト骨髓芽球様白血病細胞 ML1に対する、GGAの濃度と分化誘導作用の関係を図1に示す。

【0066】

【図1】

【0067】図1から明らかなように、GGAの濃度の増加と共に分化誘導能は増加し、20 μ MのGGA処理では約80%の細胞に分化が認められた。また細胞の増殖阻害もGGA濃度の増加と共に認められ、20 μ MのGGAで約56%の増殖が阻害された。一方NBT還元能を有する細胞は5 μ MのGGA処理で約30%の細胞に認められた。またGGAの細胞毒性は低く、20 μ MのGGA処理でもトリバンプルーで染色される死細胞は5%と非常に少なかった。従って、GGAは μ Mオーダーの低濃度でML1細胞の分化を誘導することが明らかである。

【0068】実験2 ML1細胞に対する化合物(I)の分化誘導能

ML1細胞に対する、化合物(I)の代表例の分化誘導能を表6に示した。

【0069】

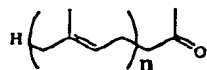
【表6】

種々のポリプレノイド基を持つ化合物のML1細胞に対する影響
(20 μ Mの各ポリプレノイド化合物でML1細胞を3日間処理した。平均±標準偏差で示す。)

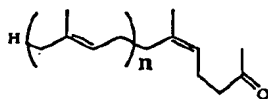
構造式 n=	一般名	N B T 還元能%	生細胞の割合%	生育阻害% (総細胞数)
A 2	グラニルアセトン	5. 6 ± 7.8	1 0 0. 0 ± 0	7 1. 7
A 3	ファルネシルアセトン	7. 9 ± 5.6	1 0 0. 0 ± 0	7 8. 3
A 4	(5E,9E,13E)-GGA, [化合物(VI)]	8 2. 2 ± 10.5**	9 4. 2 ± 5.8	3 8. 0**
B 3	(5Z,9E,13E)-GGA, [化合物(V)]	7 0. 7 ± 7.0**	9 5. 0 ± 3.2	4 7. 7*
A,B 4,3	(5E:5Z=3:2 mixture)-(GGA)	8 0. 1 ± 9.9**	9 3. 1 ± 6.1	4 3. 5**
A 5	グラニルファルネシルアセトン	0. 0 ± 0	9 7. 5 ± 0.6	5 2. 6*
A 6	ファルネシルファルネシルアセトン	0. 0 ± 0	9 9. 3 ± 0.9	6 7. 6
A 7	グラニルグラニルファルネシルアセトン	8. 9 ± 6.8	9 4. 8 ± 2.7	8 5. 4
C 4	グラニルグラニル-2-プロパノール (VI)	2 3. 9 ± 11.8	9 9. 1 ± 4.0	5 0. 5*
D 2	グラニオール	3. 1 ± 2.2	9 6. 7 ± 5.3	7 5. 0
D 3	ファルネソール	1. 7 ± 2.3	9 3. 3 ± 9.4	7 0. 7
D 5	グラニルファルネソール	0. 0 ± 0	1 0 0. 0 ± 0	5 1. 9*
D 6	ファルネシルファルネソール	0. 0 ± 0	9 7. 4 ± 1.8	6 0. 9
D 7	グラニルグラニルファルネソール	8. 9 ± 6.8	9 9. 0 ± 1.3	6 3. 9
E 1	グラナ酸	0. 0 ± 0	1 0 0. 0 ± 0	7 3. 6
	ゲファルナート	8. 6 ± 3.8	9 1. 8 ± 7.4	8 3. 7
	コントロール(未処置)	6. 8 ± 4.8	9 8. 8 ± 0.9	1 0 0. 0

•• $P < 0.01$ • $P < 0.05$

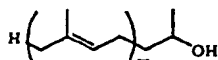
構造式A



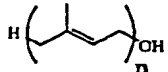
構造式B



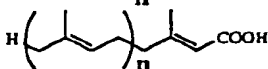
構造式C



構造式D



構造式E



【0070】ここで各化合物の試験濃度はすべて $20\mu\text{M}$ に設定した。表6から明らかなように、本発明化合物 (I) は強力な分化誘導能を有している。一方、化合物 (I) に類似したポリプレノイド骨格を有するゲラニオール、ファルネソール等のテルペノール、ゲラン酸等のテルペンカルボン酸、さらに GGA と同じく抗潰瘍作用を有するポリプレノイド誘導体であるゲファルナートには、統計学的に有意な分化誘導能は認められなかった。ML1 の細胞増殖に対しては、評価したすべて化合物が $20\mu\text{M}$ の濃度で阻害を示しが、中でも GGA が最も強い増殖阻害活性を示した。また前述の、マウス骨髓球性白血病の培養細胞系において分化誘導作用が認められたゲラニル・ファルネソール (3,7,11,15,19-ペンタメチル-2,6,10,14,18-エイコサペンタエン-1-オール) は、本実験に用

いたヒト MLI細胞系においては分化誘導作用は認められなかった。これは細胞の種差に起因する薬剤感受性の差に基づくものと考えられ、ヒトでの有効性を期待することは難しいと言える。

【0071】実験3 発生段階の異なるヒトの他の白血
病細胞に対する GGAの影響

次に発生段階の異なるヒトの他の白血病細胞に対する G GAの影響を示す。図 2 は、単芽球様 U937 細胞に対する G GAの濃度と分化誘導作用との関係を示すグラフである。

【0072】

【图2】

【0073】図2から明らかなように、GGA濃度の増加と共に分化した細胞が増加し、細胞増殖は抑制された。生細胞の割合も30 μ MのGGA処理まで95%以上であり、

細胞毒性は認められなかった。

【0074】図3には、前骨髄性白血病細胞HL60に対するGGAの濃度と分化誘導作用との関係を示す。

【0075】

【図3】

【0076】図3から明らかなように、GGAの濃度の増加と共に分化した細胞が増加し、細胞増殖は抑制された。生細胞の割合は5 μ MのGGA処理で減少し始め、35

GGA処理による分化誘導マーカーの出現

(20 μ MのGGAでML1、U937、HL60細胞を3日間処理した)

細胞種	ASDクロロアセテート エステラーゼ活性	α -ナフチルアセテート エステラーゼ活性	食食能
ML1	48.4 \pm 12.4 **	7.8 \pm 2.7	61.9 \pm 6.6 **
(未処置)	(7.7 \pm 7.6)	(5.4 \pm 1.3)	(0.0 \pm 0.0)
U937	3.8 \pm 0.9	100.0 \pm 0.0 **	49.6 \pm 7.1 **
(未処置)	(2.4 \pm 0.1)	(6.6 \pm 1.7)	(7.3 \pm 0.6)
HL60	8.1 \pm 1.1	32.3 \pm 1.6	76.4 \pm 2.8 **
(未処置)	(3.1 \pm 2.2)	(5.1 \pm 1.6)	(7.5 \pm 2.2)
HL60 (4.0 $\times 10^{-6}$ M、レチノイン酸) **			42.7
HL60 (1.2 $\times 10^{-6}$ M、1 α ,25(OH) $_2$ D $_3$) **			57.0 \pm 6.4

** P < 0.01

μ M以上の濃度では急激に減少した。

【0077】実験4 各種分化誘導マーカーおよび食食能に与えるGGAの影響

NBT還元能と細胞増殖抑制以外の、細胞が分化誘導された時に現れる性質を表7に示す。

【0078】

【表7】

【0079】ML1細胞では、白血病細胞が顆粒球に分化した時に現れるAS-Dクロロアセテートエステラーゼ活性が、7.7%から48.4%に増加した。これに対し単球(マクロファージ)に分化したときに現れる α -ナフチルアセテートエステラーゼ活性は、5.4%から7.8%へと、ほとんど変化しなかった。したがってML1細胞はGGA処理により顆粒球細胞へ分化したことが明らかである。また食食能もGGA処理により0%から61.9%へと増加した。

【0080】一方U937細胞において、AS-Dクロロアセテートエステラーゼ活性は2.4%から3.8%へとほとんど変化しなかったが、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ活性は6.6%から100%へと増加した。また食食能も7.3%から49.6%へと増加した。したがって、U937細胞はGGA処理により単球(マクロファージ)様細胞へ分化したことが明らかである。

【0081】またHL60細胞において、GGA処理によりAS-Dクロロアセテートエステラーゼ活性は3.1%から8.1%へとほとんど変化せず、 α -ナフチルアセテートエステラーゼ活性が5.1%から32.3%へと顕著に増加した。また食食能も7.5%から76.4%へと増加した。したがってHL60細胞は、GGA処理により単球(マクロファージ)様細胞へ分化したことが明らかである。

【0082】さらにRAおよび活性V.D $_3$ の至適濃度におけるHL60細胞の食食能の改善率は、文献的には、それぞれ

42.7%、57.0%でありGGAの76.4%には及ばない。これはGGAがRAおよび活性V.D $_3$ に優る強力な分化誘導能を有していることを示している。

【0083】実験5 他の制癌剤との併用効果

癌の治療には、数種類の薬剤を併用して投与する併用療法が効果的である。白血病細胞に対する既知の分化誘導剤と、GGAとの併用効果を検討した結果を図4に示す。なおこの実験においては、併用に基づく相乗効果を明確に観察できるように、GGAおよび各種制癌剤の試験濃度はそれぞれの至適濃度よりも低く設定した。

【0084】

【図4】

【0085】図4から、GGAはRA、活性V.D $_3$ 、rTNF- α 、プファリン、エトポシドあるいはインターフェロン γ (INF- γ)と併用すると、著しい分化誘導相乗効果を示すことが明らかである。この結果は、GGAを現在臨床的に白血病治療に使用され始めているRAと併用すると、治療(分化誘導)効果をさらに高められることを示しており、同等の制癌効果を保ちながら、重篤な副作用の多いRAの投与量を削減することが可能となり、癌患者のクオリティ・オブ・ライフの向上を可能とするものであると言える。

【0086】上記実験例の結果から、GGAは10 $^{-6}$ M台の濃度で発生段階の異なる各種ヒト白血病細胞の分化を誘導することが明らかである。この結果は、これまでに報

告されている分化誘導の至適濃度 (RA: 10^{-6} M、活性 V.D₅₀: 10^{-8} M) と比較して同等であり、GGAは強力な分化誘導剤の部類に入ると言える。さらに GGAはこれまで長年にわたり胃炎、胃潰瘍の治療薬として用いられてきたが、副作用はほとんど報告されておらず、極めて高い安全性が確認されている。これは上記効果例からも明らかのように、細胞毒性が非常に低いためである。

【0087】さらに本発明者らは、GGAが造血器腫瘍のみならず固形腫瘍にも有効であることを確認するために、化合物(I)の代表例として、GGAのマウス由来 B16メラノーマ細胞に対する分化誘導作用について検討した。

【0088】実験6. マウス由来 B16メラノーマ細胞に対する GGAの分化誘導作用

マウス由来 B16メラノーマ細胞に対する GGAの分化誘導作用を、メラニン生成能を指標として評価した。すなわち B16メラノーマ細胞を継代培養後、 2×10^4 セル/ml になるよう 10%FCS MEM* に加え培養用シャーレ ($\phi = 10$ cm) にて24時間培養した。培養後、各試料が毒性を示さなかつ

GGAのマウス B16メラノーマ細胞に対するメラニン生成抑制作用

処 理 方 法	培 養 細 胞 蛋 白 量 あ た り の			生育阻害 [総細胞数(%)]
	総メラニン (%)	ユーメラニン (μ g/g)	フェオメラニン (μ g/g)	
GGA (9×10^{-6} M) 添加	80.0	7.7	144	89
コントロール	100	31.6	147	100

* 総メラニン定量は吸光度法によるため、ユーメラニンとフェオメラニンの合計量に対する比率とは一致しない。

【0092】表8から明らかなように、 9×10^{-6} M の GGAにて5日間培養した処理した B16メラノーマ細胞の蛋白量あたりの総メラニン量 (ユーメラニンおよびフェオメラニン) は、コントロール培養細胞に比べ約 80%低下しており、特にユーメラニン量は約 24%に低下した。この時の細胞内チロシナーゼ量は、GGA処理により明らかに減少したことが SDS電気泳動法により確認された。また5日間培養後の細胞数は、コントロールと比較して GGA処理により約 89%に減少し、分化誘導に伴う生育阻害を受けた。B16メラノーマ細胞に対する GGAの IC₅₀(細胞の増殖を 50%阻害する濃度) は 1.1×10^{-4} M であり、メラニン生成を阻害する機構が細胞毒性によるものではないことは明確である。

【0093】上記の結果は GGAの固形腫瘍に対する有効性をも示すものであり、GGAの増殖器腫瘍の分化誘導の

た濃度 (7.5×10^{-6} M) に調製した 10%FCS MEM で培地交換を行った後、同条件で5日間培養した。培養後、等張緩衝塩類溶液 [日本製薬製、商品名: Dulbecco's PBS (-)] で洗浄し、0.25% トリアシン/エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)溶液を用いて細胞を集め、さらに上記等張緩衝塩類溶液で再び洗浄した後、遠心分離(100G)して細胞を得た。(10%FCS MEM*: 標準培地に 10%ウシ胎仔血清、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび炭酸水素ナトリウムを添加した培地)

【0089】得られた細胞に1mM-フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF) 1mlを添加したリン酸緩衝液を加えた後、及川らの方法(エール・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・メディシン[Yale J.Biol.Med.], 46, 500-507, 1973.) にしたがって総メラニン量を吸光度 ($\lambda = 400$ nm) で測定し評価した。

【0090】表8に、マウス由来 B16メラノーマ細胞に対する GGAの分化誘導作用を示す。

【0091】

【表8】

みに止まらない幅広い適応性を示唆するものである。

【0094】

【図面の簡単な説明】

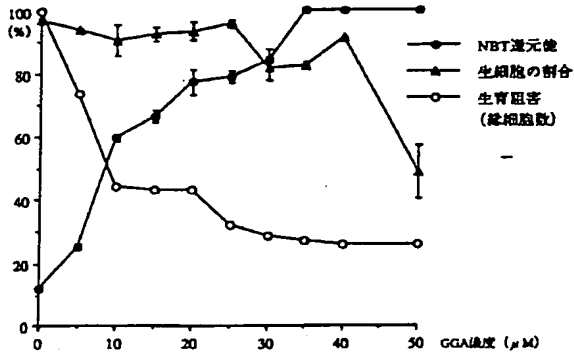
【図1】 ヒト骨髓芽球様白血病細胞 ML1に対する、GGAの濃度と分化誘導作用の関係を示した図である。(各群とも $n=3$ 、平均±標準誤差で示す)

【図2】 単芽球様U937細胞に対する GGAの濃度と分化誘導作用との関係を示した図である。(各群とも $n=3$ 、平均±標準誤差で示す)

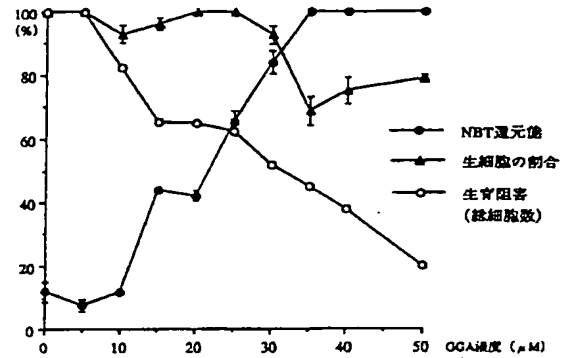
【図3】 前骨髓性白血病細胞HL60に対する GGAの濃度と分化誘導作用との関係を示した図である。(各群とも $n=3$ 、平均±標準誤差で示す)

【図4】 白血病細胞に対する既知の分化誘導剤と、GGAとの併用効果を示した図である。(各群とも $n=3$ 、平均±標準誤差で示す)

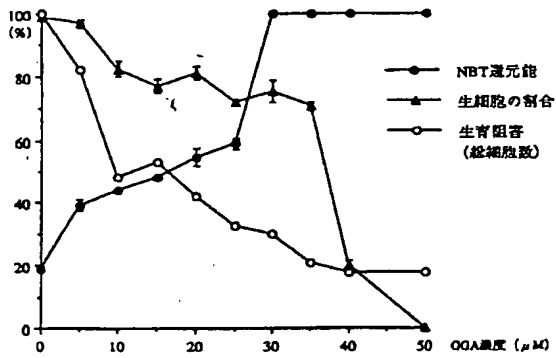
【図1】



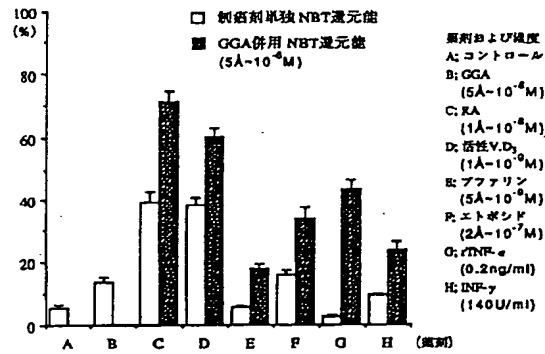
【図2】



【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 田邊 義雄
埼玉県本庄市東台 2-3-9 メゾン小
基201

(72)発明者 大沢 重光
埼玉県本庄市見福 1-10-12